

Karakterisasi Antibodi Poliklonal terhadap Aflatoksin M₁

Angriani Fusvita¹, Romsyah Maryam², Eko Sugeng Pribadi¹

¹Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Bagian Mikrobiologi Medik
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

²Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. R E Martadinata 30, Bogor
Email:angrianif@yahoo.com

Abstract

The aim of the research was characterized the polyclonal antibody at AFM₁ for diagnostic reagents on track and measure the levels of AFM₁ in milk. The series of experiments are given a polyclonal antibody testing dimetilaminobenzidin (DAB) by dot blot immunoassay (DBIA) so it will look brown color display on the positive control sample; purification and estimation antibody of AFM₁ concentration with ammonium sulfate; dialysis; fractionation using HiTrap Protein A HP column, measured using a spectrophotometer at a wavelength of 280 nm; and characterized of IgG using SDS-PAGE. DBIA test results showed a typical reaction between antigen AFM₁-BSA with AFM₁-BSA antibody to rabbit serum in the form of brown dots after addition of DAB substrate. The results of spectrophotometric against rabbit serum fractionation showed the type of IgG heavy chain.

Keywords : Aflatoxin M₁, polyclonal antibody, IgG

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi antibodi poliklonal terhadap Aflatoksin M₁ (AFM₁) sebagai reagens diagnostik untuk melacak dan mengukur kadar AFM₁ di susu. Rangkaian percobaan adalah pengujian antibodi poliklonal yang diberi substrat dimetilaminobenzidin (DAB) dengan *dot blot immunoassay* (DBIA) sehingga akan terlihat tampilan warna coklat pada contoh pengendali positif; pemurnian dan perhitungan kadar antibodi AFM₁ yang diendapkan dengan ammonium sulfat; dialisis; fraksinasi menggunakan kolom *HiTrap Protein A HP*, dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm; serta karakterisasi IgG menggunakan SDS-PAGE. Hasil uji DBIA menunjukkan adanya reaksi khas antara antigen AFM₁-BSA dengan antibodi terhadap AFM₁-BSA dalam serum kelinci dalam bentuk noktah berwarna coklat setelah penambahan substrat DAB dan H₂O₂. Hasil spektrofotometrik terhadap fraksinasi serum kelinci menunjukkan adanya satu jenis IgG dengan rantai berat.

Kata kunci : Aflatoksin M₁, antibodi poliklonal, IgG

Pendahuluan

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma yang disebut globulin dan sekarang dikenal sebagai imunoglobulin (Tizard, 1988; Baratawidjaja dan Rengganis 2012). Antibodi yang didapatkan dari imunisasi dikenal sebagai antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal merupakan antibodi yang dihasilkan oleh limfosit B yang berasal dari banyak tipe klon karena tanggapan dari ikatan antigen dengan epitop limfosit B yang berbeda-beda (Burgess, 1995). Produksi antibodi poliklonal dari proses imunisasi terhadap hewan umumnya dilakukan pada mamalia. Hewan yang sering digunakan sebagai produksi antibodi poliklonal diantaranya kambing, kuda, marmut, kelinci, hamster, tikus, domba, dan ayam. Kelinci dan mencit merupakan hewan laboratorium yang paling umum digunakan sebagai produksi antibodi. (Koivunen dan Krogsrud, 2006). Antibodi poliklonal diterapkan untuk melacak berbagai pencemaran pada bahan pangan atau pakan serta hasil olahannya seperti aflatoksin (Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013)

Aflatoksin M₁ (AFM₁) merupakan metabolit aflatoksin B₁ (AFB₁) dari hasil hidroksilasi. Ketika hewan ruminansia diberi makan dengan pakan yang mengandung AFB₁, metabolit ini dapat diubah menjadi AFM₁. Dengan demikian, kadar AFM₁ dalam susu dan hasil olahannya tergantung pada tingkat paparan dan jumlah AFB₁ di dalam pakan yang tertelan (Pei *et al.*, 2009). AFB₁ dan AFM₁ bersifat toksik akut dan kronis untuk hewan dan manusia yang menyebabkan gangguan kesehatan dalam bentuk kerusakan hati akut, sirosis hati, induksi tumor (Deshpande, 2002). AFB₁ dikenal sebagai hepatokarsinogen paling kuat pada mamalia (Virdis *et al.*, 2008). Meskipun toksisitas AFM₁ lebih

rendah dibandingkan AFB₁, akan tetapi senyawa ini tetap memiliki sifat hepatotoksik dan karsinogenik (Lee *et al.*, 2009). Berdasarkan sifat toksisitasnya, awalnya AFM₁ diklasifikasikan oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) sebagai karsinogen Grup 2B pada manusia (IARC, 1993) dan kini telah diklasifikasikan sebagai karsinogen Grup 1 (IARC, 2002). AFM₁ ini dapat termakan oleh manusia, terutama bayi dan anak-anak, melalui susu segar, susu pasteurisasi, susu UHT, susu formula bahkan air susu ibu (Abdulrazzaq *et al.*, 2003; Widiastuti *et al.*, 2006).

Antibodi poliklonal terhadap AFM₁ dapat dihasilkan melalui kelinci yang diimunisasi dengan antigen AFM₁-BSA untuk merangsang pembentukan tanggap kebal pada kelinci. Antibodi mempunyai manfaat sebagai reagens diagnostik untuk melacak dan mengukur bahan biologi (Burgess, 1995). Tujuan penelitian ini adalah mengkarakterisasi antibodi poliklonal terhadap AFM₁ yang akan digunakan sebagai reagens diagnostik untuk melacak dan mengukur kadar AFM₁.

Materi dan Metode

Antibodi poliklonal

Antibodi (Ig) poliklonal yang digunakan adalah antibodi milik BB LITVET. Hewan coba kelinci yang digunakan untuk menghasilkan Ig poliklonal mendapatkan jadwal dan metode imunisasi yang sama seperti yang dijelaskan oleh Wang *et al.*, (2011). Kelinci disuntik 250 µg konjugasi AFM₁- *Bovine Serum Albumin* (BSA) dalam satu mililiter 0,01 M *phosphat buffer saline* (PBS) yang dicampur dengan satu mililiter *Freund Complete Adjuvant* (FCA) secara intradermal di

sekitar 30 tempat di tubuhnya. Penyuntikan ke-2 untuk tujuan mendorong kerja antigen dilakukan secara subkutan di empat tempat di paha kelinci. Contoh darah dikumpulkan setiap bulan yang diambil melalui pembuluh darah vena dari telinga kelinci dalam jangka waktu sepuluh hari setelah penyuntikan ke-2. Serum dipisahkan dan selanjutnya dilakukan pengujian keberadaan antibodi poliklonal menggunakan teknik *dot blot immunoassay*.

Dot Blot Immunoassay (DBIA)

Antigen AFM₁-BSA diencerkan dengan perbandingan 1:200 menggunakan larutan penyangga karbonat-bikarbonat pH 9,6. Sebanyak dua mikroliter suspensi antigen diteteskan di atas permukaan membran nitroselulosa pada titik kendali positif dan titik kendali negatif, setelah itu mengeringkannya pada suhu 30 °C. Membran nitroselulosa yang mendapatkan tetesan direndam dalam larutan *tween-tris-casein* 0,2% (TTC) selama satu jam dan kemudian dicuci dengan larutan PBS 0,01M (pH 7,4) yang mengandung 1% *Tween-20* (PBS-T). Kemudian, membran dikeringkan kembali pada suhu 30 °C. Sebanyak dua mikroliter antibodi AFM₁-BSA, yang terlebih dahulu diencerkan dengan perbandingan 1:100 dalam PBS, diteteskan ke membran nitroselulosa pada titik kendali positif, sedangkan pada titik kendali negatif hanya diteteskan dua mikroliter larutan PBS. Membran nitroselulosa dikeringkan dan dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak dua mikroliter Ig G kambing anti-Ig G kelinci enzim konjugat HRP (1:20.000) diteteskan di membran nitroselulosa dan dicuci kembali sebanyak tiga kali menggunakan PBS-T. Membran nitroselulosa yang

telah mendapatkan antigen dan antibodi tersebut direndam dalam larutan substrat DAB yang ditambahkan hidrogen peroksida (H₂O₂) dan dalam rentang waktu 3-5 menit hingga muncul warna coklat pada titik kendali positif. Membran nitroselulosa dikeringkan pada suhu 30 °C.

Pemurnian dan penghitungan kadar antibodi poliklonal terhadap AFM₁

Pemurnian antibodi poliklonal dilakukan dengan teknik dialisis dan fraksinasi menggunakan kolom *HiTrap Protein A HP* (Amersham Biosciences). Serum yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat dimasukkan ke kantong dialisis dan direndam selama tiga hari di dalam PBS pH 7,6 pada suhu 4 °C. Larutan penyangga diganti setiap hari hingga tidak terdapat lagi ion sulfat di dalam larutan PBS terakhir yang diganti. Pemeriksaan ion sulfat dilakukan dengan cara menambahkan larutan barium klorida (BaCl₂) 5%. Apabila larutan PBS yang ditambahkan larutan BaCl₂ 5% menjadi bening, hal ini menandakan tidak ada lagi ion sulfat. Proses fraksinasi dilakukan menggunakan kolom *HiTrap Protein A HP*. Kolom diisi dengan 25 ml larutan penyangga fosfat dan membilas kembali dengan 50 ml larutan penyangga fosfat. Sebanyak dua mililiter larutan antibodi yang telah didialisis dimasukkan ke dalam kolom dan kemudian ditambahkan 8,0 mililiter larutan penyangga fosfat ke dalam kolom yang sama. Kolom yang sama dicuci dengan 35 ml larutan penyangga fosfat. Antibodi dielusi dengan 20 ml larutan penyangga sitrat dan sebanyak dua mililiter fraksi ditampung ke dalam botol penampung berisi larutan penyangga *tris-HCL*. Kadar antibodi (IgG) yang telah dimurnikan dari tiap-tiap fraksi diukur dengan spektrofotometer UV

Vis pada panjang gelombang 280 nm dan dihitung menggunakan rumus: $Kadar\ Ig\ G = Absorbansi\ 280 \times faktor\ pengenceran / 1,35$ (Harlow dan Lane, 1988).

Karakterisasi imonoglobulin G (Ig G)

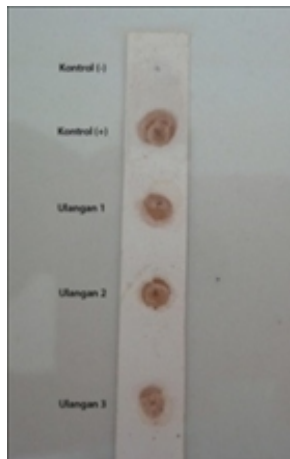
Keberadaan Ig G dilacak dengan menggunakan teknik *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Teknik ini dilakukan dengan membuat jel pemisah (*separating gel*) menggunakan 12 % jel yang terdiri dari 3,34 ml air suling, 2,5 ml *Tris-HCl* 1,5 M (pH 8,8), 0,1 ml SDS stock 10% (w/v) , dan 4,0 ml *Acrylamide/Bis* (30%, 2,67%). Selanjutnya, ditambahkan 0,06 ml larutan amonium persulfat (10%) dan 10 μ l N,N,N',N'- tetrametilenadiamina (TEMED). *Stacking gel* 4,5 % terdiri dari 2,95 ml air suling, 1,25 ml *Tris-HCl* 0,5 M (pH 6,8), 0,05 ml SDS 10% (w/v) , 0,7 ml *Acrylamide/Bis* (30%, 2,67%), menambahkan amonium persulfat 0,05 ml (10%) dan 0,008 ml TEMED. *Stacking gel* dituangkan di atas jel pemisah dan mendingkannya selama 30 menit agar terjadi polimerisasi. Antibodi dan penanda (*molecular weight markers*) dipanaskan selama lima menit dan memasukkannya masing-masing sebanyak 0,03 ml ke dalam sumur pada *stacking gel*. Proses elektroforesis vertikal dilakukan pada 140 volt selama 45 menit (Mini vertical slab gel/Biorad Laboratories). Setelah waktu tercapai, jel diangkat dan diwarnai dengan pewarnaan *coomassie blue* G250 selama dua jam sambil menggoyang-goyangkannya secara perlahan. Kemudian jel diangkat dan dihilangkan warnanya menggunakan larutan penyangga penghilang warna (*destaining buffer*) hingga terlihat pemisahan pita-pita yang jelas pada jel.

Hasil dan Pembahasan

Pengujian keberadaan antibodi poliklonal

Keberadaan antibodi poliklonal AFM₁ di dalam serum kelinci dapat dilacak menggunakan teknik DBIA yang ditandai dengan noktah berwarna coklat seperti yang terpapar pada Gambar 1. Warna tersebut merupakan hasil reaksi antara enzim HRP yang terkonjugasi pada IgG dengan peroksida pada substrat sehingga terlihat warna coklat setelah bereaksi dengan substrat DAB. Aulanniam (2005) memaparkan bahwa kompleks antibodi yang terlarut dalam serum dengan antigen dapat terdeteksi dengan penambahan konjugat atau anti terhadap imonoglobulin yang dilabel enzim.

Pada kontrol positif serum yang digunakan adalah serum yang dihasilkan dari kelinci yang telah diimunisasi dengan antigen AFM₁-BSA. Hal ini menunjukkan kemungkinan adanya reaksi yang dapat menghasilkan antibodi spesifik yang terdeteksi oleh antigen AFM₁-BSA. Pada kontrol negatif tidak terbentuk adanya noktah berwarna coklat setelah penambahan substrat DAB, hal ini disebabkan pada pemberian serum digantikan dengan hanya memberikan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sehingga tidak ada reaksi spesifik antara antibodi terhadap AFM₁-BSA dengan antigen AFM₁-BSA. Dari hasil tersebut diduga antibodi yang dihasilkan memiliki kadar yang tinggi karena warna coklat yang dihasilkan begitu pekat. Menurut Pertiwi *et al.* (2009), mutu dari warna dot blot yang ditampilkan menunjukkan seberapa tinggi kadar antibodi terhadap antigen yang dilapiskan pada membran nitroselulosa.

Gambar 1. Hasil DBIA (*Dot Blot Immunoassay*)

Pemurnian dan perhitungan kadar antibodi aflatoksin M₁ (AFM₁)

Penegasan kemurnian dan penghitungan kadar antibodi yang dimurnikan dari serum kelinci diukur menggunakan spektrofometer pada panjang gelombang 280 nm seperti terpapar pada Tabel 1.

Tabel 1 Angka absorbansi dan kadar IgG pada setiap fraksi serum kelinci yang diimunisasi dengan AFM₁

Fraksi	Absorbansi (280 nm)	Kadar IgG (mg/mL)
F1	0,630	0,467
F2	0,649	0,481
F3	2,639	1,952
F4	2,406	1,782
F5	1,187	0,879
F6	0,552	0,409
F7	0,273	0,202
F8	0,203	0,150
F9	0,139	0,103
F10	0,107	0,079
Total		6,504

Karakterisasi IgG

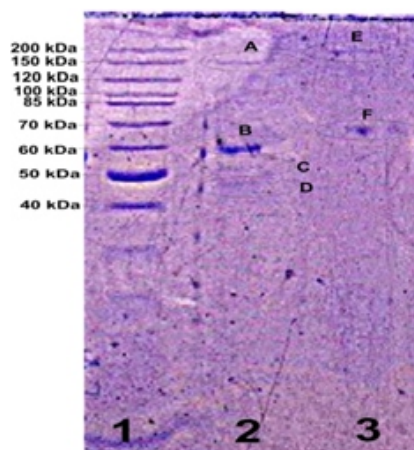
Antibodi poliklonal yang terdapat pada fraksi-fraksi hasil elusi serum kelinci yang dimurnikan melalui kolom *HiTrap Protein A HP* dikonfirmasi dengan SDS-PAGE. Hasil pemisahan pita imunoglobulin ditunjukkan pada Gambar 2. Fraksi yang diperiksa dengan teknik elektroforesis

Grafik spektrofotometrik memperlihatkan hanya ada satu puncak dari grafik yang dihasilkan yang menunjukkan bahwa hanya ada satu zat, satu antibodi, yang ada di dalam serum kelinci yang diperiksa. Hal ini dikarenakan kolom *HiTrap Protein A HP* mempunyai kemampuan mengikat fragmen *crystallizable* (Fc) pada molekul Ig G sehingga dapat menghasilkan Ig G yang murni. Tabel 2 memaparkan data kadar Ig G yang terdiri dari 10 fraksi dan total kadar Ig G yang dihasilkan sebesar 6,504 mg/ml. Burges (1995) memaparkan kemurnian maupun kekhususan antibodi dapat ditingkatkan dengan menghilangkan protein serum yang tidak diinginkan. Umumnya makin murni antibodi maka makin spesifik antibodi tersebut, tetapi antibodi yang murni tidak relatif memiliki kadar yang tinggi.

ini adalah Fraksi 1 pada Baris 3 dan Fraksi 3 pada Baris 2. Fraksi 3 membentuk empat pita (A - D) yang masing-masing memiliki berat molekul 150 kDa (pita A) yang diduga sebagai IgG; 59,649 kDa (pita B); 53,635 kDa (pita C); dan 47,397 kDa (pita D). Pita B, C dan D diduga merupakan IgG dengan rantai berat. Fraksi 1 membentuk dua pita (E - F) dengan

masing-masing memiliki berat molekul 168,993 kDa (pita E) yang diduga sebagai IgG dan 65,406 kDa (pita F) yang diduga merupakan IgG rantai berat. Berat molekul IgG berkisar antara 150-160 kDa (Harlow dan Lane, 1988; Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Molekul IgG yang diberi perlakuan dengan bahan kimia, seperti SDS, akan memecah ikatan disulfida dan menyebabkan molekul IgG terurai menjadi empat rantai polipeptida yang terpisah. Diantara rantai tersebut adalah rantai “berat” karena masing-masing mempunyai berat molekul sekitar 50 kDa dan dua rantai lainnya “ringan” karena masing-masing

mempunyai berat molekul sekitar 25 kDa (Tizard, 1988). Keberadaan IgG dengan berat molekul 60 kDa dan 28 kDa juga pernah didapatkan oleh Nikolayenko *et al.* (2005). Copestake *et al.* (2006) melaporkan bahwa IgG standar membentuk 5 pita dengan 2 pita dominan pada 60 kDa (rantai berat) dan 30 kDa (rantai ringan), dua pita berada pada ukuran >94 kDa, dan satu pita lainnya berada pada ukuran <60 kDa. Hasil elektroforesis ini menegaskan hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometer bahwa hanya ada satu jenis imunoglobulin saja pada fraksi dari serum kelinci, yaitu IgG dengan rantai berat.



Gambar 2. Karakterisasi antibodi poliklonal yang diperoleh dengan penyuntikan AFM₁ pada kelinci. Marker (Baris 1), Fraksi 3 (Baris 2), Fraksi 1 (Baris 3)

Kesimpulan

Hasil karakterisasi yang diuji dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa antibodi tersebut merupakan imunoglobulin G (Ig G) yang memiliki bobot molekul 150 kDa, 168,993 kDa serta Ig G dengan rantai berat.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor Jawa Barat yang

telah mendukung dan membantu hingga terselesaikannya penelitian ini. Ucapan terima kasih yang mendalam juga disampaikan ke Peneliti dan Teknisi di Laboratorium Toksikologi.

Daftar Pustaka

- Abdulrazzaq Y.M., Osman, N., Yousif, Z.M., Al-Falahi, S. (2003). Aflatoxin M₁ in breastmilk of UAE women. *Ann. Trop. Paediatr.* 23(3): 173 – 179.
- Aulanniam. (2005). Protein dan Analisisnya. Malang: Citra Mentari Group.

- Baratawidjaja K.G. dan Rengganis, I. (2012). *Imunologi Dasar Edisi 10*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Burgess, G.W. (1995). *Teknologi ELISA dalam diagnosis dan penelitian*. Edisi Indonesia. Artama WT penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Copestake, D.E.J., Indyk, H.E. and Otter, D.E. (2006). Affinity liquid chromatography method for the quantification of immunoglobulin G in colostrum powders. *AOAC International* 89(5): 1249-1256.
- Deshpande, S.S. (2002). Fungal toxins. In S. S. Deshpande (Ed.), *Handbook of food toxicology*. New York. Marcel Decker.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York . Pp1-2.78-85.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans (p. 245). Vol. 56. Lyon, France: World Health Organisation.
- IARC. International Agency For Research On Cancer. (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans (p. 171). Vol. 82. World health organization.
- Koivunen, M.E and Krogsrud, R.L. (2006). Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical *Laboratories*. *Labmedicine*. 37 (8): 490-497.
- Lee, J. E., Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Jeon, T. H. (2009). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*. 20: 136-138.
- Liu B.H., Hsu, T.Y., Lu, C.C. and Yu, F.Y. (2013). Detecting aflatoxin B₁ in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*. 30 :184-189.
- Nikolayenko, I.V., Galkin, O.Y., Grabchenko, N.I. and Spivak, M.Y. (2005). Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 2: 3-11.
- Tizard. (1988). *Pengantar Imunologi Veteriner*. Edisi II. Partodiredjo, M. penerjemah. Surabaya: Airlangga University Press.
- Pei, S.C., Zhang, Y.Y., Eremin, S.G. and Lee, W.J. (2009). Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control*. 20 :1080-1085.
- Pertiwi, W., Sartono, T.R., Sumarno dan Adi S. (2009). Sensitivitas dan spesifisitas metode dot blot menggunakan antigen outer membrane protein *Klebsiella pneumoniae* yang direspon secretory-immunoglobulin A sputum penderita terinfeksi *Klebsiella pneumonia*. *J Respirologi*:1-15.
- Virdis S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A.L. and De Santis, E.P.L. (2008). Occurrence of aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*. 19: 44-49.
- Wang J.J., Liu, B.H., Hsu, Y.T. and Yu, F.Y. (2011). Sensitive Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip For Detection Aflatoksin M₁ In Milk. *Food Control*. 22: 64-969.
- Widiastuti, R., Maryam, R., Bahri, S. and Firmansyah, R. (2006). Aflatoxin Residues (AFM₁) in Fresh Dairy Milk in Pangalengan and Bogor District, West Java. Seminar Nasional Teknologi Peternakan and Veteriner. Bogor (ID): Balai Penelitian Veteriner.